

JAROSŁAW CIERPISZ, WITOLD GOLNIK, ANNA LASKOWSKA**, MACIEJ UGORSKI*

Wykrywanie zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni w nasieniu ogierów metodą cytometrii przepływowej

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej i *Katedra Biochemii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR ul. C. K. Norwida 31, 50-375 Wrocław
**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław

Cierpisz J., Golnik W., Laskowska A., Ugorski M.

Flow Cytometry in the detection of Equine Arteritis Virus in stallion semen

Summary

In the study flow cytometry was attempted to identify EAV infection in stallions' semen. Material for the study consisted of 8 semen samples taken from EAV-seropositive stallions. The samples were put on RK-13 and Vero cells. After a 24-hour incubation period the cells were treated with a specific conjugate and then analyzed in FACS apparatus. In the case of two samples positive fluorescence was observed. The above positive result was confirmed by virus isolation in both cell cultures used.

Wirusowe zapalenie tętnic koni (Equine Viral Arteritis – EVA) jest obecnie jedną z najgroźniejszych chorób wirusowych u tego gatunku zwierząt, a centralnym ogniwem łańcucha epizootycznego choroby jest zakażony ogier – siewca wirusa z nasieniem (1, 2, 11). Opracowanie metod szybkiego wykrywania wirusa zapalenia tętnic koni (Equine Arteritis Virus – EAV) w nasieniu ogierów ma na celu stworzenie dokładnego systemu kontroli ogierów użytkowanych w rozrodzie oraz ograniczenie nowych przypadków zakażeń wirusem. Do wykrywania wirusa w nasieniu stosowane są: izolacja wirusa w hodowlach komórkowych, reakcja łańcuchowej polimeryzacji (PCR) oraz próba biologiczna.

Cytometria przepływowa jest nowoczesną metodą pozwalającą na ocenę szeregu parametrów życiowych komórek, jak również na badanie struktur tak wewnątrzkomórkowych jak i położonych na ich powierzchni. W analizie komórek, które utrzymywane są w zawiesinie, wykorzystuje się ich właściwości rozpraszania światła oraz światło emitowane przez związki fluorescencyjne. Pomiar rozproszenia światła pozwala na rozróżnienie komórek zależnie od ich wielkości, jak również na odróżnienie komórek żywych od martwych. Źródłem fluorescencji komórek są fluorochromy przyłączone do tzw. sond fluorescencyjnych, z których najszersze zastosowanie znalazły przeciwciała wykorzystywane do wykrywania antygenów obecnych na powierzchni komórki. Drugim źródłem fluorescencji są naturalne składniki komórek. Pomiarów dokonuje się w aparacie FACS (fluorescence – activated cell sorter). Obok analiz jakościowych, możliwe są również pomiary ilościowe pozwalające na przykład na określenie ilości antygeny obecnego na powierzchni komórki, co odbywa się poprzez pomiar światła emitowanego przez fluorochrom związany ze

swoistym przeciwciałem (3, 8). Możliwości cytometrii przepływowej spowodowały olbrzymie zainteresowanie ze strony naukowców oraz jej wykorzystywanie w diagnostyce medycznej, immunologii i biologii (4–6, 10). Cytometria przepływowa znalazła swoje zastosowanie również w naukach weterynaryjnych (7, 9).

Celem pracy była próba zastosowania cytometrii przepływowej w identyfikacji wirusa EA w nasieniu ogierów.

Materiał i metody

Do badań użyto nasienie pobrane od 8 ogierów w surowicy krwi których wykryto przeciwciała neutralizujące anty-EAV. Próby nasienia oznaczono jako 1/JC, 2/JC, 3/JC, 4/JC, 14/JC, 15/JC, 20/JC oraz DIX. Próbę izolacji wirusa wykonano na dwóch stałych liniach komórkowych: nerki królika RK-13 oraz nerki małpy Vero. użytym markerem do wykrywania wirusa EA metodą cytometrii przepływowej był konjugat fluorescencyjny wykonany w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Stanowiły go przeciwciała klasy IgG, otrzymane z surowicy konia immunizowanego szczepem Bucyrus wirusa EA, poprzez wysolenie siarczanem amonu i po oczyszczeniu wyznakowane FITC w stosunku 7,2 częst. FITC/1 częst. IgG (6,9 mg białka/ml). W etapie wstępnym zakażano badanym nasieniem (rozcieńczonym uprzednio 1:20 w Minimum Essential Medium) 24-godzinne hodowle komórkowe. Tak przygotowane komórki przetrzymywano w polistyrenowych butlach do hodowli komórkowej (Corning) o powierzchni wzrostu 75 cm² w termostacie o temperaturze 37°C z 5% dopływem CO₂. Po 24 godzinnej inkubacji komórki oglądano pod mikroskopem odwróconym i następnie zbierano przy pomocy roztworu EDTA-trypsyny. Po 3-krotnym przemywaniu buforem, komórki zawieszano w roztworze konjugatu fluorescencyjnego (rozcieńczonego 1:4 w PBS). Inkubację przeprowadzano w temperaturze

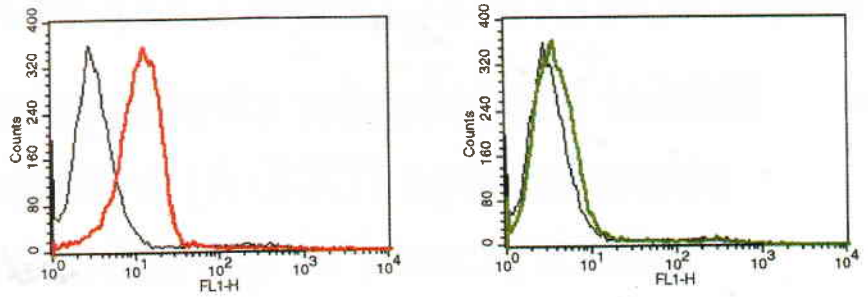
pokojoyej przez 45 minut, kilkakrotnie wstrząsając. Po tym czasie komórki 3-krotnie przepłukiwano i zawieszano w roztworze TBS-BSA o składzie: 50 mM Tris-HCl, 180 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 18 mM MgSO₄ z dodatkiem 1% BSA (Sigma) i NaN₃.

Analizę komórek przeprowadzono w cytometrze FACS Calibur (Becton Dickinson) przy pomocy programu Cell Quest software with Mac App (1996). Obok próbek właściwych, jako kontrole wykorzystano komórki wyjściowe, nie inkubowane z przeciwciałami (kontrola autofluorescencji) oraz komórki niezakażone wirusem, inkubowane z konjugatem.

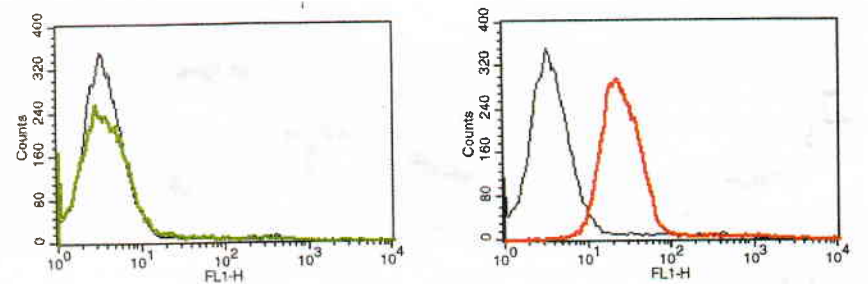
Wyniki i omówienie

Próba izolacji wirusa zapalenia tętnic koni w hodowlach komórkowych, wykazała jego obecność w próbkach nasienia oznaczonych jako 20/JC oraz DIX. Analogiczne wyniki uzyskano za pomocą analizy cytofluorymetrycznej komórek zakażonych tymi samymi próbkami nasienia. Stwierdzono, że komórki inokulowane próbkami 20/JC i DIX wykazują znacznie podwyższoną fluorescencję w porównaniu z komórkami, które inkubowano z nasieniem ogierów wolnym od wirusa EA. Podwyższone wiązanie przeciwciał anti-EAV obserwowano zarówno w przypadku komórek linii RK-13 jak i Vero (ryc. 1, ryc. 2). Poziom wiązania tych przeciwciał był niemal identyczny z wynikiem otrzymanym dla wiązania konjugatu do komórek zakażonych standardowym szczepem Bucyrus EAV. Stwierdzono również, że natężenie fluorescencji emitowane przez komórki inkubowane z nasieniem ogierów nie będących siewcami wirusa EA, odpowiada autofluorescencji tych komórek (ryc. 3). W wielu przypadkach obserwowano natomiast różnice w liczbie komórek poddawanych analizie cytofluorymetrycznej, co najprawdopodobniej spowodowane jest licznym zamieraniem komórek RK-13 i Vero podczas ich inkubacji ze znakowanymi przeciwciałami anti-EAV. Komórki obu linii są adherentne, co utrudnia utrzymanie ich w zawiesinie i w połączeniu z innymi czynnikami wpływa na różnice ilościowe, obserwowane w histogramach. Należy podkreślić, że otrzymane znaczące różnice w natężeniu fluorescencji pomiędzy komórkami zakażonymi EAV i wolnymi od wirusa obserwowano przy bardzo słabo zaznaczonym efekcie cytopatycznym (CPE) w zakażonej hodowli komórkowej.

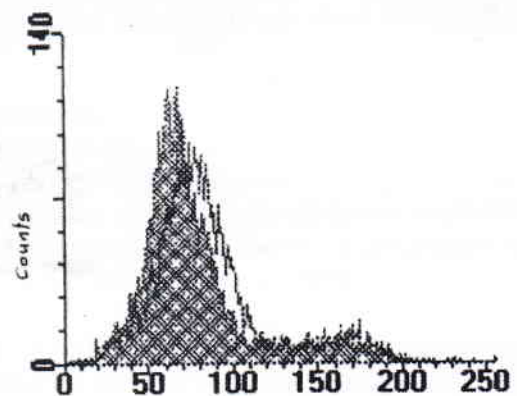
Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania cytometrii przepływowej, obok próby izolacji wirusa w hodowlach komórkowych i łańcuchowej reakcji polimeryzacji w diagnostyce wirusowego zapalenia tętnic koni.



Ryc. 1. Histogram fluorescencji komórek RK-13 zakażonych nasieniem badanych ogierów. Linia czerwona – natężenie fluorescencji komórek zakażonych nasieniem zawierającym EAV, linia zielona – natężenie fluorescencji komórek zakażonych nasieniem nie zawierającym EAV, linia czarna – kontrola ujemna



Ryc. 2. Histogram fluorescencji komórek Vero zakażonych nasieniem badanych ogierów. Linia czerwona – natężenie fluorescencji komórek zakażonych nasieniem zawierającym EAV, linia zielona – natężenie fluorescencji komórek zakażonych nasieniem nie zawierającym EAV, linia czarna – kontrola ujemna



Ryc. 3. Histogram autofluorescencji komórek RK-13 i komórek RK-13 inkubowanych z nasieniem ogierów nie zawierającym EAV. Pole zakratkowane – autofluorescencja

Piśmiennictwo

1. Cierpisz J.: Rozprzestrzenienie zakażeń wirusem zapalenia tętnic koni u ogierów użytkowanych w rozrodzie. Praca dokt. Wydział Medycyny Weterynaryjnej AR, Wrocław, 1996.
2. Golnik W., Cierpisz J.: Medycyna Wet. 50, 482, 1994.
3. Hopkins J.: Vet. Immunol. 27, 101, 1991.
4. Kantorski J.: Cent.-Eur. J. Immunol. suppl. 2, 21, 87, 1996.
5. Kawiak J.: Cent.-Eur. J. Immunol. suppl. 2, 21, 94, 1996.
6. Kawiak J., Skierski J. S.: Post. Biol. Kom. 19, 239, 1992.
7. Kluciński W., Winnicka A., Kawiak J., Hoser G., Miks B., Bańkowski R., Sitarzka E., Kleczkowski M.: Medycyna Wet. 53, 588, 1997.
8. Kraj P.: Immunol. Pol. 91, 16, 1991.
9. Siwicki A. K.: Cent.-Eur. J. Immunol. suppl. 2, 21, 191, 1996.
10. Taylor J., Milthorpe B.: J. Histochem. Cytochem. 28, 1224, 1980.
11. Timoney P. J., McCollum W. H., Roberts A. W.: Proc. Am. Ass. Equine Pract. 32, 57, 1986.

Adres autora: dr Jarosław Cierpisz, ul. Osobowicka 124B, 51-004 Wrocław